УДК: 577.3.

В.И. Поротиков, А.М. Хохлов, Л.М. Чайлахян,
А.А. Катаев, В.А. Яшин, А.А. Деев
Институт экспериментальной и теоретической биофизики РАН, г. Пущино, Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Институт биологического приборостроения РАН, г. Пущино

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В СОХРАНЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ

Успехи исследований по криоконсервации клеток для сохранения генетических ресурсов общеизвестны. Однако проблему сохранения генетических ресурсов нельзя рассматривать только с точки зрения криоконсервации. Ее надо ставить в комплексе с такими задачами, в частности, как разработка не повреждающих методов оценки *in vitro* жизнеспособности сперматозоидов, яйцеклеток и зародышей. Оплодотворенные яйцеклетки необходимо довести до стадии получения зародыша, а также обеспечить возможность получения генетически идентичного потомства в количестве, гарантирующем дальнейшее воспроизведении вида.

На первом месте, как мы считаем, стоит необходимость разработки методов оценки жизнеспособности половых клеток и зародышей, хотя хочется сказать несколько слов и о криконсервации. Когда Б.Н. Вепринцев еще начинал работать над проектом сохранения генетических ресурсов, уже существовал метод оценки жизнеспособности клеток с помощью флуоресцентного зонда для регистрации электрического потенциала мембраны, что в принципе позволяло отслеживать состояние клетки в процессе замораживания и оттаивания. С тех пор большое развитие получило применение флуоресцентных зондов для измерения внутриклеточного pH, внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}, мембранного потенциала митохондрий. Однако, насколько нам известно, эти методы не нашли широкого применения в криобиологии. Определение критической зоны формирования льда между -15° C и -60° C в процессе замораживания и оттаивания является хорошим показателем применения биофизических методов. Интересно дополнить эти исследования характеристикой состояния мембраны и внутриклеточной среды, включая митохондрии.

Методы оценки жизнеспособности половых клеток наиболее развиты для сперматозоидов и основываются на применении флуоресцентных меток или измерении подвижности. В последнее время разработан метод, когда применение сразу трех флуорохромов позволило быстро с помощью проточного флуориметра оценить жизнеспособность сперматозоидов после оттаивания и целостность комплекса акросома – плазма мембраны сперматозоида [1]. Один из красителей - пропидиум диоцид (PI)(670 nm) специфически связывается с ДНК и естественно, что, если мембрана сперматозоида не повреждена, он не проникает внутрь и не светится. Другой краситель SYBR-14 (515-545 nm) способен проникать через мембрану также взаимодействует с ДНК и служит как бы дополнительным индикатором жизнеспособности сперматозоидов. Третий краситель – (PE-PNA) – фикоэритрин, конъюгированный с агглютинином из арахиса (581-583 nm) не проникает через мембрану и дает информацию относительно сохранности комплекса акросома -сперматозоид, высвечиваясь зеленым светом при нарушении комплекса. Еще одно его достоинство –он не взаимодействует с частицами яичного желтка и может применяться без соответствующей отмывки сперматозоидов, предотвращая излишнею возможность повреждения сперматозоидов в процессе отмывки и одновременно повышая точность измерений. Метод трех красителей нашел свое дальнейшее развитие в применении вместо SYBR-14 внутриклеточных индикаторов pH, типа carboxy-SNARF-1 или SYTO –17.

Измерение подвижности сперматозоидов для оценки их жизнеспособности получило большое развитие [2]. В начале это было наблюдение за подвижностью сперматозоидов под микроскопом и ручной подсчет частоты пересечения какой то условной границы. Затем стали фотографировать траекторию движения сперматозоидов в тёмнопольном микроскопе на остановленный кадр. Применение кинематографических камер с соответству-

ющими световыми спец. эффектами значительно расширило возможности исследования динамики движения сперматозоидов. Все эти методы были дорогими и медленными. Были попытки применять эффект Доплера, лазерную технику. Однако, подлинное продвижение вперед произошло при появлении телевизионной техники с ССД камерами и возможностью прямого подключения к компьютеру. Применения современной регистрирующей техники и компьютеров позволяет уйти от ошибок и разбросов данных, связанных с индивидуальными свойствами наблюдателя, хорошо документировать, полученные результаты наблюдений, существенно повысить точность регистрации и что немаловажно, а может наиболее важно, ввести в обиход новые параметры, характеризующие подвижность сперматозоидов, регистрировать которые без соответствующей техники невозможно. Например, на многих объектах показано, что регистрация подвижности должна проводится с частотой не менее 60 Гц, а оптимально с частотой 200 Гц, иначе искажается траектория движения. Установлена высокая степень корреляции между подвижностью сперматозоидов и их способностью оплодотворять яйцеклетку. Существует много подходов к анализу характеристики подвижности сперматозоидов, но наиболее употребительными являются три: криволинейная траектория, прямолинейная траектория и усредненная между ними. Криволинейная траектория - это истинная траектория движения сперматозоида в плоскости. Прямолинейная траектория – это минимальное расстояние между точкой начала движения сперматозоида и его конечной точкой. Усредненная – это средняя между двумя первыми.. Подвижность сперматозоидов определяется эффективностью работы жгутика, которая характеризуется такими параметрами как отношение расстояния от головки жгутика по изгибу жгутика до некоторой точке на жгутике и прямым расстоянием до той же точки от головки жгутика. Далее идут такие параметры как двойная амплитуда волны изгиба жгутика, длина волны изгиба жгутика, угол изгиба жгутика, радиус криволинейности и, наконец, частота биения жгутика.

В настоящее время в лабораторных и клинических исследования подвижности сперматозоидов широкое распространение получили компьютерные системы анализа подвижности сперматозоидов "CASA"-computer-aided sperm analysis. В лабораторных условиях имеется много их модификаций в зависимости от задачи исследований. Известны две фирмы которые выпускают коммерческие варианты системы CASA в первую очередь для клиник, хотя их также можно использовать для научных исследований по сохранению ценных видов.

После того, как стало известно о высокой эффективности оплодотворения яйцеклетки при ведении внутрь ее даже малоподвижного сперматозоида (ICSI – intracytoplasmic sperm injection), появились разработки специализированных микропипеток для этой цели. Среди них обращает на себя внимание пьезоуправляемая пипетка, в комплект с которой входит также микропипетка для удержания яйцеклетки [3]. Пъезоуправляемая пипетка выполняет две функции: прокалывает мембрану яйцеклетки с помощью пъезоэлектрического сверла и вводит сперматозоид внутрь клетки.

Группа французских ученых разрабатывает микроробот для оплодотворения *in vitro*(4). Основной частью этого устройства является автоматический инъектор спермы в цитоплазму. Он должен содержать модуль для удаления кумулюсных клеток, модуль, характеризующий яйцеклетку, модуль для микроинъекции и модуль для транспортировки сперматозоидов. Другая из разработанных подсистем основана на измерении упругости яйцеклеток как характеристики ее состояния.

Для сохранения генома и его быстрейшего размножения ближайший соратник Б.Н.Вепринцева по приборостростроению А.М.Хохлов разработал устройство и серию приспособлений для хирургического разделения зародыша на несколько частей с разным содержанием бластомеров. Это направление является одним из перспективных способов получения близнецов от 2 до может быть 16. Обнадеживает его перспективность серия работ, в которой показана, что бластомеры, инъецированные в яйцеклетку, дают *in vitro* близкий процент к норме в формировании новых зародышей [5]. Большие надежды на успешность применения этого метода совместно с предварительной биохимической обработки матрикса исходного зародыша перед применением инструментальных методов разделения.

Перечисленные выше методы работы со сперматозоидами и яйцеклетками могут быть реализованы в техническом плане на основе совместной работы ИТЭБ РАН, ИБП РАН и ИБК РАН.

SUMMARY

A concept for a integrated approach towards the implementation of the idea of genetic resource conservation is considered, which primarily includes development of biophysical methods for evaluating viability of oocytes, spermatozoids, and embryos. Further, opportunities for obtaining two genetically identical twins for reproduction of rare and vanishing species is discussed.

Литература

1. Szabolcs Nagy, Johannes Jansen, Einko K. Topper, and Barend M. Gadella «A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles» BIOLOGY OF REPRODUCTION. 2003, v. 68. P. 1828–1835.
2. S.T. Mortimer «A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals» Human reproduction update, 1997, v. 3, № 5. P. 403-439.
3. K. Ediz and N.Olgac «Microdynamics of the Piezo-Driven Pipetts in ICSI», IEE TRANSACTIONS BIOMEDICAL ENGINEERING. 2004, (july), v. 51, №7.
4. Boukallel M, Gauthier M, Piat E, Abadie J, Roux C. «Microrobots for in vitro fertilization applications» Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2004 May; v. 50, № 3. P. 267-274.
5. First NL, Prather RS. «Production of embryos by oocyte cytoplast-blastomere fusion in domestic animals». J Reprod Fertil Suppl. 1991, v.43, pp.245-254.

Г.В. Земков, А.М. Тихомиров, Т.И. Акимочкина

Астраханский Государственный Университет

К БИОТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ РЕПРОДУКТИВНЫХ КЛЕТОК РЫБ

В результате исчезновения или резкого падения численности популяций ценных промысловых видов рыб и других животных возникла проблема сохранения их генофонда. Одним из перспективных направлений в этой области явились исследования по криоконсервации репродуктивных клеток животных в атмосфере жидкого азота при температуре -196° С. Результаты этих исследований давно используют для хранения образцов эякулята (спермы) самцов сельскохозяйственных животных.

Замораживание репродуктивных клеток самцов рыб с целью их длительного хранения сопряжено с рядом трудностей, связанных с толерантностью клеток в условиях сверхнизкой температуры. В последние 20 лет опубликовано большое количество работ, в которых обсуждаются различные аспекты по выяснению причин резкого снижения качества спермиев после хранения их в жидком азоте.

Основной причиной повреждения или снижения подвижности клеток при замораживании является кристаллизация внутри- и внеклеточной воды. Из материалов опубликованных работ известно, что основные силы повреждения клеток возникают на пути замораживания и дефростации спермы в результате напряжения, возникающего в связи с электрополяризацией и акустической эмиссией в процессе кристаллизации воды.

Несмотря на успешные разработки различных методов криоконсервации репродуктивных клеток рыб, по прежнему продолжаются исследования по совершенствованию технологии хранения биоматериала в условиях сверхнизкой температуры по следующим вопросам: для криозащиты клеток и субклеточных элементов разрабатываются протекторы, составными частями которых являются различные по химической природе вещества (глицерин, диметилсульфоксид, сахароза, этиленгликоль, жирные кислоты и др.).

Все вопросы по криозащите клеточного материала от повреждения в той или иной степени уже в настоящее время успешно решены, о чем свидетельствуют многие опубликованные работы.

В настоящее время, по нашему мнению, необходимо углубление исследований по изучению механизма криоповреждений клеток, что можно схематично представить в следующих направлениях:

- в связи с тем, что известные криопротекторы, включая разработанные нами, позволяют сохранить клетки от деструкции, необходимо определить физико-химические факторы, негативно действующие на подвижность спермиев. С этой целью важно изучить активность ферментов, участвующих в процессах моторики спермиев. Очевидно, с этой целью потребуется изучить энзимы не только спермиев, но и окружающей клетки среды (спермы). В современной научной литературе уже есть